

**FACULTE DE MEDECINE
SAINT-ANTOINE
UNIVERSITE PARIS VI**

ANNEE 1971

THESE

N^o

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

Yvon BROSSARD

Né le 16 septembre 1942 à SAINT LAURENT SUR SEVRE (85)

Ancien Externe des Hôpitaux de PARIS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

**ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE DOSAGES DES ANTICORPS
ANTI-D DANS LA SURVEILLANCE DE L'INCOMPATIBILITE
FOETO-MATERNELLE Rh**

Président : M. R. ANDRE, Professeur

EDITIONS MEDICALES



ET UNIVERSITAIRES

40, rue Pascal - PARIS XIIIe

**FACULTE DE MEDECINE
SAINT-ANTOINE
UNIVERSITE PARIS VI**

ANNEE 1971

THESE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

Yvon BROSSARD

Né le 16 septembre 1942 à SAINT LAURENT SUR SEVRE (85)

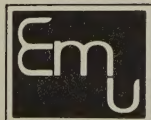
Ancien Externe des Hôpitaux de PARIS

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

**ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE DOSAGES DES ANTICORPS
ANTI-D DANS LA SURVEILLANCE DE L'INCOMPATIBILITE
FOETO-MATERNELLE Rh**

Président : M. R. ANDRE, Professeur

EDITIONS MEDICALES



ET UNIVERSITAIRES

40, rue Pascal - PARIS XIIIe



A Monsieur le Professeur Robert AUBRY

A MES PARENTS

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Médecin des Hôpitaux de Paris

A MA FEMME

Docteur Département de Transfusion
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MES ENFANTS

Qui a bien voulu partager votre vie et
s'adonner avec l'équipe médicale de la

Maladie Néonatale du Nouveau-Né au

A MA SOEUR

Centre Départemental de Transfusion de Paris

A Monsieur le Docteur

A MES AMIS

Médecin de Centre Hospitalier Temporaire

Chef de Laboratoire dans le Service de la Maladie

Néonatale du Nouveau-Né

Il est l'initiateur de ce travail et m'a
été un soutien moral, grâce à lui, j'ai
développé mon intérêt pour la

Son activité et son exceptionnelle disponi-
bilité m'ont permis de bénéficier de la
sécurité de ses connaissances et de son
jugement.

A Monsieur François FUMER

Médecin de Centre Hospitalier Temporaire

Chef de Service à la Maladie Néonatale du

Nouveau-Né

En remerciements pour les conseils et les
encouragements qu'il m'a donnés.

Son ouverture d'esprit, sa patience, sa
clairvoyance m'ont été d'un grand secours.

A MES PARCOURS

A MA FLEUR

A MES ENFANTS

A MA SOEUR

A MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543719_0022

A Monsieur le Professeur Robert ANDRE

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Médecin des Hôpitaux de Paris
Directeur du Centre Départemental de Transfusion
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu présider cette thèse et
m'admettre dans l'équipe médicale de la
Maladie Hemolytique du Nouveau-Né au
Centre Départemental de Transfusion de Paris

Au Docteur Regis CREGUT

Hemobiologiste du Cadre Hospitalier Temporaire
Chef de Laboratoire dans le Service de la Maladie
Hémolytique du Nouveau-Né

Il est l'initiateur de ce travail et c'est
avec enthousiasme que, grâce à lui, j'ai
découvert l'immuno-hématologie.

Son amitié et son exceptionnelle disponibi-
lité m'ont permis de bénéficier de la
sûreté de ses connaissances et de son
jugement.

Au Docteur François PINON

Hemobiologiste du Cadre Hospitalier Temporaire
Chef de Service à la Maladie Hémolytique du
Nouveau-Né

En remerciements pour les conseils et les
encouragements qu'il m'a donné.

Son ouverture d'esprit, sa patience, sa
clairvoyance m'ont été d'un grand secours.

A Madame Le Docteur Thérèse BOREAU

Ancienne Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Chef de Clinique à la Faculté

Pour leur concours personnel

A mes Collègues :

BERNARD

BERNARDINI

BOUQUET

BOUQUET

BOUQUET

A Madame BOUQUET

En collaboration a été présentée

A Madame BOUQUET

Pour l'élaboration technique de cette thèse

A Madame BOUQUET, aux "Équipes", aux laboratoires,
aux Supérieurs

Pour leur compréhension et leur patience.

Aux Docteurs :

BAUDELLOT

HUCHET

MAIGRET

MAYNIER

POULAIN

SENDER

Pour leur concours permanent

A mes Collègues :

BERNARD

BRIFFOTEUX

DELORME

HARLEY

ROSIER

A Mademoiselle GOSSET

Sa collaboration m'a été précieuse

A Madame MIVIELLE

Pour l'élaboration technique de cette thèse

A Mademoiselle DELY, aux "Equipières", aux Laborantines,
aux Secrétaires

Pour leur compréhension et leur patience.

INTRODUCTION

Lorsqu'on injecte à des adultes normaux des globules rouges Rh positif sensibilisés par un anticorps anti-D, il existe une corrélation directe entre la quantité d'anticorps fixé sur les cellules et leur survie dans la circulation générale (1-2).

Ainsi, pour un anti-D particulier il a été trouvé (2) que la demi-vie des hématies injectées était proportionnelle au carré de la quantité d'anticorps présent sur ces hématies ! Des quantités aussi minimes que 0,03 ug/ml d'hématies peuvent entraîner des demi-vies de 4 à 5 jours. Pour des quantités supérieures croissantes, la demi-vie des hématies injectées diminue progressivement jusqu'à atteindre un minimum de 30 minutes environ, durée limite qui correspond au temps de passage de la totalité de la masse sanguine au travers de la rate, les hématies sensibilisées étant alors toutes captées en une seule fois (1).

Il serait, à priori, étonnant de retrouver une relation aussi étroite entre l'atteinte foetale et le conflit immunologique D anti-D dans l'incompatibilité foeto-maternelle Rh. En effet le degré de saturation des globules rouges foetaux par l'anticorps n'est pas le seul déterminant physiopathologique de la maladie hémolytique. Il ne constitue que le mail-
lon moteur d'une chaîne de réaction mettant en jeu différentes fonctions du foetus qui ont leur propre dynamique et dont la variété d'expression, d'un foetus à l'autre serait, selon certains auteurs (3), telle qu'elle expliquerait de larges disparités d'atteinte à agression immunologique égale.

Ainsi la "susceptibilité" et la capacité de Phagocytose du SRE, le pouvoir de réponse érythropoïétique, seraient à ce point variables entre les foetus, qu'ils joueraient à côté du conflit immunologique, un rôle majeur dans le déterminisme de la gravité de l'atteinte Rh (3).

Cependant, aussi longtemps qu'on n'aura pu estimer le conflit immunologique D anti-D in-vivo tout au long de la grossesse, et en donner une mesure globale qui tienne compte à la fois de la durée, de l'intensité du conflit immunologique et de ses variations dans le temps, toutes les affirmations concernant les rôles respectifs de tel ou tel paramètre dans l'atteinte foetale ne seront qu'hypothèses. En particulier, il n'est pas possible de retenir comme appréciation globale du conflit immunologique, telle que nous venons de la définir, le degré de saturation des hématies à un moment donné de la grossesse. En dehors des difficultés pratiques insurmontables qu'une telle évaluation pourrait rencontrer en cours de grossesse, celle-ci ne serait que l'expression momentanée du conflit D anti-D qui ne tiendrait compte ni de l'intensité ni de la durée de ce conflit et encore moins de ses variations dans les mois précédents et à venir de la grossesse.

En effet, le degré de saturation par l'anticorps des globules rouges n'est surement pas invariable pendant la vie in-utéro car il dépend :

- de l'anticorps maternel qui peut apparaître ou augmenter à des moments différents de la grossesse dans des proportions variables,
- du passage transplacentaire de l'anticorps maternel qui s'accroît avec la durée de la gestation, indépendamment du taux sérique de la mère,
- de la concentration en antigène globulaire Rh dont l'augmentation va de pair avec la maturation foetale et l'érythropoïèse mais qui décroît proportionnellement à l'anémie.

Ainsi, on peut très bien concevoir que deux nouveaux-nés ayant une égale quantité d'anti-D sur leurs globules rouges au moment de l'accouchement soient atteints à des degrés divers par la maladie Rhésus, si l'un a du subir l'anticorps maternel pendant toute la grossesse et si l'autre n'a eu à le supporter que peu de temps avant l'accouchement.

Néanmoins, il existe (3) une relation statistique large mais significative entre la quantité d'anticorps présent sur les globules rouges de nouveau-nés atteints de maladie hémolytique Rh et leur taux d'hémoglobuline cordonale (fig. a). Si bien que tout porte à croire qu'un rapport bien plus étroit unit le conflit immunologique in-vivo à l'atteinte foetale.

Le seul moyen dont on dispose en pratique pour tenter d'apprécier ce conflit chez les femmes enceintes iso-immunisées Rh est le dosage des anticorps maternels tout au long de la grossesse. Or, de l'avis unanime, l'anti-D maternel estimé par les méthodes classiques de titrage, possède une valeur pronostique très décevante (4) : un titre élevé d'anti-D pendant toute la grossesse, pouvant très bien correspondre à une atteinte modérée et vice-versa. De là, à conclure que l'anticorps maternel ne peut servir d'indicateur valable du conflit immunologique in-vivo et, à fortiori du risque encouru par le fœtus, ou bien que l'intensité du conflit immunologique in-vivo n'est qu'un facteur de gravité parmi d'autres, il n'y a qu'un pas. Mais on peut, aussi, se demander si le recours aux méthodes classiques de titrages, et en particulier au titrage classique en Coombs indirect constitue la meilleure façon de titrer l'anti-D maternel dans l'optique de LA SURVEILLANCE DE L'INCOMPATIBILITE FOETO-MATERNELLE Rh. Les connaissances acquises ces dernières années sur les anticorps anti-D et la réaction D anti-D in-vitro permettent d'en douter.

Après avoir exposé brièvement les progrès essentiels faits dans cette connaissance, nous tenterons d'en déduire une analyse critique du titrage des anti-D en Coombs indirect.

Nous appliquerons dans une deuxième partie les conclusions de cette analyse à l'étude d'une nouvelle méthode, entièrement automatisée, de dosages de l'anti-D du sérum maternel mise au point par le Dr CREGUT dans le laboratoire du service du Dr PINON, au CENTRE DEPARTEMENTAL DE TRANSFUSION SANGUINE. Nous confronterons, ensuite, les résultats des différentes méthodes de dosages avec l'atteinte des enfants à la naissance.

P R E M I E R E P A R T I E

On distingue, classiquement, deux sortes d'anticorps anti-D :

- Les anticorps complets agglutinant en milieu salin à 9‰ les hématies qu'ils sensibilisent : ils entrent dans la classe des immunoglobulines M et ne peuvent traverser le placenta. Ils ne jouent donc aucun rôle dans l'atteinte foetale.
- Les anticorps dits "incomplets" car nécessitant l'emploi d'artifices (milieu macro-moléculaire, enzymes protéolytiques, sérum anti-globuline) pour provoquer une agglutination qui ne se fait pas en solution saline seule : ces anticorps entrent dans la classe des immunoglobulines G et traversent le placenta : ils sont responsables de la maladie hémolytique.

Ces deux types d'anticorps immuns se retrouvent en quantités variables dans les sérums de femmes iso-immunisées Rh, le titre en anticorps incomplets étant, en général, très supérieur. Il ne sera question ci-dessous que de ceux-ci.

LA REACTION D ANTI-D IN-VITRO, L'HETEROGENEITE DES ANTI-D

Les études menées sur la cinétique de la réaction D anti-D in-vitro, à l'aide des marqueurs isotopiques des anticorps (anti-D gamma-G. et anti-gamma-globuline G, marqués à l'iode radio-actif) ont confirmé que cette réaction était réversible et obéissait à la loi d'action de masse (5. 6. 7. 8. 9. 10).

Ainsi :
$$Ac + Ag \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} (Ag \text{ } Ac)$$

où :
 Ac est l'anticorps libre et
 Ag est l'antigène libre,
 (Ag Ac) est le complexe antigène-anticorps
 k₁ est la constante de vitesse d'association et
 k₂ la constante de vitesse de dissociation de la réaction.

Lorsque, à l'équilibre, il se forme dans le même temps, autant de complexes qu'il s'en dissocie, on peut écrire l'égalité suivante :

$$\frac{r}{Ac \times Ag} = \frac{k_1}{k_2} = K \quad (I)$$

où :
 r est la concentration en complexes antigène-anticorps
 Ac est la concentration en anticorps libre
 Ag la concentration en antigène libre
 K la constante d'équilibre de la réaction

A partir de la méthode utilisant les traceurs iodés, on a pu calculer, en se servant d'égalités dérivées de la loi d'action de masse :

1) La richesse antigénique de globules rouges Rh positif de différents phénotypes

Avec quatre échantillons examinés, en moyenne, dans chaque phénotype étudié, le nombre de sites antigéniques a été trouvé le plus bas avec des hématies R₁ r (entre 10.000 et 14.000 sites/G.R.) et le plus élevé avec des hématies R₂ R₂ (25.000 et 33.000 sites/G.R.) ; le phénotype pour lequel l'écart des valeurs trouvées dans les quatre échantillons testés a été le moindre est le phénotype cc D E e (génotype probable R₂ r : 14.000 à 16.000 sites/G.R.).

2) Les valeurs des constantes d'équilibre K

~ La valeur de la constante K n'est pas identique pour tous les systèmes D anti-D. En effet, cette grandeur (qui peut s'exprimer comme étant l'inverse de la concentration en antigène globulaire libre quand, à l'équilibre, dans un milieu mettant en présence l'antigène D et l'anticorps anti-D la moitié de l'anticorps est consommée) peut varier d'un système à l'autre de 10^7 Mole $^{-1}$ /litre à 10^9 Mole $^{-1}$ /litre, soit dans un rapport de 1 à 100 (fig. b).

~ Cette hétérogénéité des constantes d'équilibre est liée à l'anti-D et non à l'antigène Rh. En effet, avec un même anti-D la constante K ne varie pas si l'on prend des globules Rh positif de sujets différents. Par contre, en utilisant les mêmes globules Rh positif, la valeur de K change selon l'anti-D étudié (11).

Nous tenterons plus loin d'apprécier l'importance pratique de cette hétérogénéité.

3) L'index d'hétérogénéité d'une population d'anti-D (10)

En effet, dans tout sérum contenant de l'anti-D il existe, en proportions variables, des anticorps de constantes d'équilibre différentes se répartissant probablement de façon gaussienne autour d'une valeur moyenne. C'est ainsi que l'on peut définir pour chaque sérum un index d'hétérogénéité et une constante d'équilibre moyenne. (fig. b)

L'index d'hétérogénéité et la constante d'équilibre moyenne ne sont pas des valeurs immuables dans un sérum (11). Ainsi, chez des sujets préalablement immunisés, une re-stimulation par injection de globules Rh positif entraîne, parallèlement à l'augmentation de la concentration pondérale en anti-D, une augmentation notable de la valeur de la constante d'équilibre moyenne (HUGUES-JONES et coll 1970)

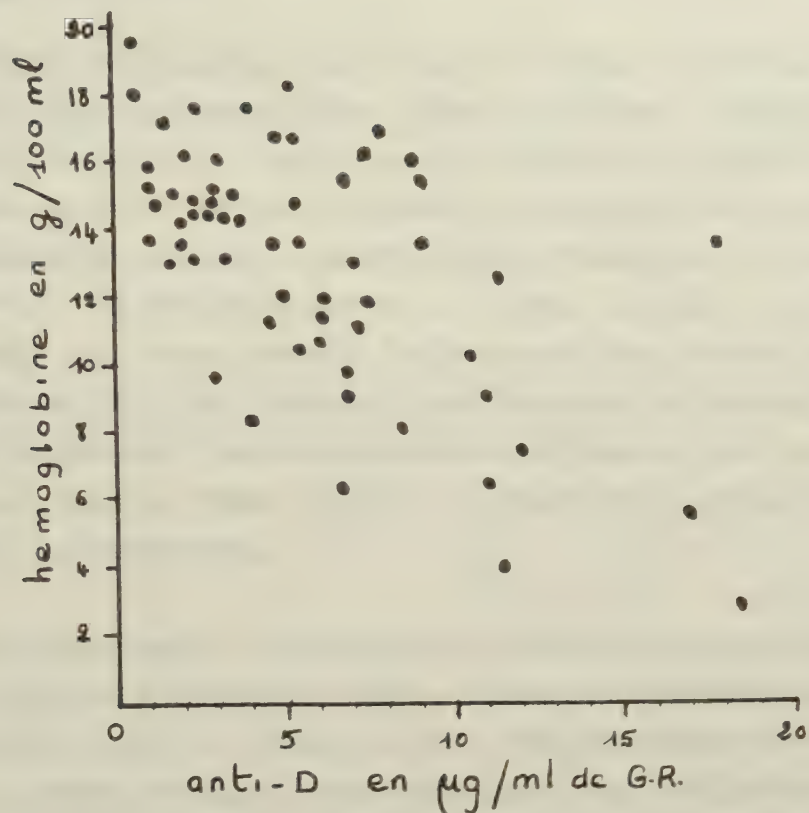


Fig a. RELATION ENTRE LA QUANTITÉ D'ANTICORPS FIXÉ
SUR LES G.R. A L'ACCOUCHEMENT ET L'HEMOGLOBINE CORDONALE
 (D'APRÈS HUGHES-JONES ET COLL.)

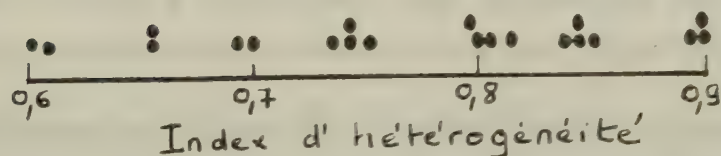
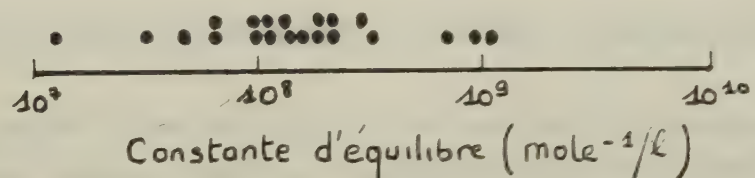


Fig b RÉPARTITION DES CONSTANTES D'ÉQUILIBRE ET DES INDEX
D'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE VINGT ET UN EXEMPLES D'ANTI-D
 (D'APRÈS HUGHES-JONES)

4) La concentration pondérale d'anti-D d'un sérum ou d'un pool de sérum (12.8.10)

La concentration en anti-D des sérums de femmes enceintes iso-immunisées Rh varie très largement d'une femme à l'autre. Toutes les concentrations peuvent s'observer entre un anti-D présent seulement à l'état de trace (inférieur à 0,01 μg) et uniquement décelable par des méthodes sérologiques utilisant de faibles concentrations d'hématies et une concentration de 300 à 400 μg d'anti-D par ml de sérum. Cependant, pour la très grande majorité des femmes donnant naissance à des enfants atteints de maladie hémolytique Rh, les concentrations d'anti-D dépassent rarement 10 $\mu\text{g/ml}$ ce qui représente une concentration suffisante pour provoquer un état d'anasarque chez un fœtus placé au contact d'une telle concentration pendant toute une grossesse.

Telles sont, brièvement résumées, les principales acquisitions récentes sur la réaction D anti-D in-vitro. Elles ont immédiatement trouvé un champ d'application dans la prévention de l'iso-immunisation Rh. Nous allons tenter de montrer qu'elles permettent aussi une meilleure compréhension de certains aspects de l'incompatibilité foeto-maternelle Rh, et qu'elles impliquent une révision des méthodes de titrages des anti-D dans la perspective de la surveillance de grossesses incompatibles Rh.

LE TITRAGE EN COOMBS INDIRECT : DEFINITION- VARIABLES AFFECTANT SA VALEUR

Le titre d'un anti-D dans un sérum, c'est-à-dire la dernière dilution de ce sérum rendant encore possible l'agglutination des globules sensibilisés à son contact, dépend de nombreuses variables. Les unes, spécifiques tiennent à la réaction D anti-D ; les autres, aux phénomènes non spécifiques de l'agglutination des globules rouges sensibilisés par un anticorps.

Différentes méthodes de titrage de l'anti-D ont été et sont encore utilisées jusqu'à ce jour. Elles visent, par des moyens différents à provoquer l'agglutination d'hématies sensibilisées par des anticorps incomplets et sont donc ainsi, étroitement tributaires des phénomènes non spécifiques de l'agglutination.

L'intérêt du titrage en Coombs indirect (TCI) sur les autres méthodes de titrage est de minimiser l'influence des variations du milieu sur les phénomènes non spécifiques de l'agglutination.

En effet, l'agglutination dans le test de Coombs normal dépend :

- des hématies : ce sont des hématies normales, non traitées par les enzymes (les effets du traitement enzymatique sont variables et difficilement contrôlables);
- du milieu dans lequel se produit l'agglutination : c'est le milieu salin à 9‰ donc un milieu simple et de composition fixe,
- d'une réaction immunologique : la réaction anti-D anti-globuline.
 - Selon son origine, une molécule gamma-globuline d'anti-D peut fixer de 6 à 9 molécules d'anti-gamma-globuline (11.10). Si cette différence peut introduire une cause d'erreur dans l'estimation de la concentration pondérale des anti-D par les méthodes radio-actives (10.11), elle ne joue vraisemblablement pas de rôle dans l'agglutination de globules sensibilisés par différents anti-D (1).
 - Le choix de la dilution optimale (c'est-à-dire donnant l'agglutination la plus intense) de l'anti-globuline utilisée, ne pose guère de problèmes dans le test de Coombs avec des globules sensibilisés par un anti-D : entre une concentration d'anti-globuline insuffisante et une concentration trop importante (effet inhibiteur sur l'agglutination), il y a place pour un éventail assez large de dilutions qui donnent une intensité d'agglutination équivalente et optimale à sensibilisation globulaire égale.

Ainsi, l'intensité de l'agglutination obtenue par la méthode de Coombs dans ces conditions techniques (hématies normales, milieu salin 9‰, dilution convenable de l'anti-globuline utilisée) est étroitement dépendante de la quantité d'anti-D fixé sur les hématies donc du nombre de sites antigéniques Rh saturés (12.13). Il a pu être ainsi calculé

par différents auteurs (13.10) que la quantité minimum d'anti-D détectable par le test à l'antiglobuline sur hématies normales, correspondait à 350-500 sites saturés par hématie sensibilisée, ce qui est remarquablement fixe, compte-tenu de la part subjective qui rentre dans la lecture d'une agglutination limite et de la provenance différente des anti-globulines utilisées.

Si bien, que, à fortiori, pour un même observateur opérant dans des conditions techniques identiques avec tous les sérums à titrer en TCI, et employant une même anti-globuline à la concentration convenable, l'on peut raisonnablement supposer que la quantité d'anticorps présent sur les globules rouges sensibilisés par la dernière dilution de sérum donnant encore un TCI positif est la même, quel que soit le sérum considéré.

Nous pouvons alors formuler le titre d'un anti-D en TCI de cette façon :

$$T = \frac{N}{n_o}$$

N : concentration en anti-D du sérum pur

n_o : concentration en anti-D présente dans la dernière dilution de ce sérum donnant un test de Coombs positif.

Or, n_o , peut être obtenu à partir de l'égalité (I) en posant que la concentration en anticorps libre est égale à la différence entre la concentration en anticorps total initialement présent (n_o) et la concentration en complexes antigène-anticorps (r_o).

$$\text{soit : } Ac = n_o - r_o$$

Ainsi, n_o peut s'écrire :

$$n_o = \frac{r_o}{Ago \times K} + r_o \quad (II)$$

r_0 est la concentration en Mole/litre de complexe antigène-anticorps *.

r_0 peut se formuler comme étant, dans ce cas particulier, le produit du nombre de globules rouges par litre (a) et de la plus petite quantité d'anti-D, exprimée en Mole, (c) détectable en Coombs sur une hématie.

D'autre part, la concentration en complexes antigène-anticorps r_0 est une fraction de la concentration en antigène libre, (Ago) qui peut s'exprimer ainsi :

$$\frac{r_0}{\text{Ago}} = \frac{1}{x}$$

L'égalité devient alors :

$$r_0 = \frac{1}{x \cdot K} + a \cdot x \cdot c \quad (\text{III})$$

Ainsi le titre devient en utilisant : (III)

$$T = \frac{N}{\frac{1}{xK} + a \cdot c} \quad (\text{IV})$$

où l'on voit que :

1°) Le titre est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans le sérum pur (N)

2°) Le titre est proportionnel à la valeur de la constante d'équilibre de l'anticorps (K)

* Mole ou moléculegramme d'une substance : c'est la masse, exprimée en grammes, de N (nombre d'Avogadro) molécules de cette substance. C'est aussi, exprimé en grammes, le poids moléculaire de cette substance. Pour les antigènes Rh, dont on ignore le poids moléculaire, la concentration molaire est convertie en sites (assimilés chacun à une molécule d'antigène) supposition faite qu'une molécule d'anti-D se fixe à une seule molécule d'antigène.

3°) Que le titre est proportionnel à la richesse antigénique des hématies utilisées pour titrer. En effet, à sensibilisation égale, le pourcentage de saturation des sites antigéniques Rh d'une hématie est d'autant moindre que l'hématie est plus riche en antigène Rh. La valeur du rapport $\frac{1}{x}$ décroît donc quand la richesse antigénique Rh des hématies augmente.

4°) Qu'il est inversement proportionnel à la concentration en globules choisis pour titrer (a)

5°) Qu'il est inversement proportionnel à c (cf P. 9)

Nous allons tenter d'analyser l'importance respective de ces quatre derniers facteurs sur le titre.

Dans la mesure où nous ne considérons ici que le titre en C.I. sur hématies normales, c peut être considéré comme constant (en effet, le minimum d'anti-D détectable en Coombs par hématie traitée par les enzymes est inférieur mais probablement aussi très variable selon le traitement enzymatique subi).

D'autre part, la richesse antigénique des hématies Rh positif peut varier, nous l'avons vu, dans un rapport 1 à 3. Son influence sur le titre peut être considérée comme constante si des hématies de même génotype sont prises pour titrer, surtout s'il s'agit d'hématies R2/r dont la teneur en antigène semble la moins sujette à variations dans la population (11).

Dans ces conditions, $1/x = \text{constante}$.

INFLUENCE DE LA CONSTANTE K D'UN ANTICORPS SUR LE T.C.I. DE CET ANTICORPS

Prenons deux sérums, S1 et S2, dont les concentrations pondérales en anti-D sont identiques mais de constantes K_1 et K_2 , respectivement égales à $10^9 \text{ Mole}^{-1}/1$ et $10^7 \text{ Mole}^{-1}/1$, chiffres donnés par HUGHES JONES comme étant des valeurs extrêmes de constantes d'équilibre moyennes

d'anticorps anti-D. Titrons ces sérums avec différentes concentrations d'hématies dont la teneur en antigène égale à $3 \cdot 10^{-10}$ /Mole/ml de globules rouges (chiffre équivalent à la teneur en antigène de globules R₂/r).

Les rapports des titres peuvent être calculés en fonction de la concentration globulaire utilisée, à l'aide de l'égalité (V), dérivée de la loi d'action de masse, où n_1 et n_2 représentent les quantités d'anticorps initialement présentes dans les dilutions donnant le titre final des sérums S_1 et S_2 .

En effet :

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{\frac{N}{\frac{1}{x \cdot K_1} + a \cdot c}}{\frac{N}{\frac{1}{x \cdot K_2} + a \cdot c}} = \frac{n_2}{n_1}$$

Donc :

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\frac{1}{x \cdot K_2} + a \cdot c}{\frac{1}{x \cdot K_1} + a \cdot c}$$

Dans la mesure où la concentration en antigène saturé est négligeable devant la concentration en antigène libre (ce qui est le cas) on peut assimiler l'antigène libre à l'antigène total (libre et combiné)

Ainsi a. c peut s'écrire :

$$a. c = \frac{Ag \ T}{x}$$

Donc :

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\frac{1}{K_2} + Ag \ T}{\frac{1}{K_1} + Ag \ T} \quad (V)$$

en prenant les chiffres cités plus haut, (V) devient :

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{10^{-7} + Ag \ T}{10^{-9} + Ag \ T} = \frac{T_1}{T_2}$$

En faisant varier la concentration globulaire utilisée pour titrer, de 1 % à 40 % (abscisses) on obtient des rapports T_1/T_2 (ordonnées) différents (fig. c). On voit sur cette courbe que deux anticorps équivalents en quantité mais de constante K égales respectivement à 10^9 et 10^7 Mole⁻¹/l. auront, s'ils sont titrés à la concentration globulaire de 1 %, des titres aussi différents que, par exemple, 1/512 pour le premier et 1/32 pour le second ; ou bien qu'à titres égaux à 1 % correspond une concentration en anti-D 25 fois supérieure pour l'anti-D de faible constante K. Si ces deux mêmes anticorps sont titrés à 4 % (concentration voisine de celle habituellement utilisée pour titrer) le rapport calculé des titres est dix, ce qui, là encore, indique théoriquement une très médiocre concordance entre les quantités et les titres des anti-D d'une population de femmes iso-immunisées Rh.

La confirmation de ces données théoriques a été fournie par HUGHES JONES (3) : la comparaison entre la quantité d'anticorps présent sur les

globules rouges de nouveau-nés atteints de maladie hémolytique et le titre de l'anticorps élué des mêmes globules, fait apparaître (fig D) que, pour une même quantité d'anticorps, une différence de trois tubes en dilutions géométriques est la règle, ce qui correspond à un rapport de titres égal à 8 ; une différence de 4, voire de cinq tubes, étant même observée. Inversement, à titre égal correspondent des concentrations d'anti-D variant dans un rapport de 6 à 7 en moyenne.

Cette discordance entre la concentration pondérale des différents anti-D et leur titres en Coombs est d'autant plus marquée que la concentration en antigène globulaire utilisée est faible.

Elle est encore sensible à la concentration de 10 % ; par contre entre 15 % et 40 % le rapport des quantités reste à peu près fixe, de l'ordre de 3, ce qui ferait varier au maximum d'un tube en dilution géométrique les titres de deux sérums dont l'anti-D serait en égale concentration mais avec des constantes K extrêmes.

Nous avons arbitrairement choisi, pour titrer, des globules rouges de richesse antigénique moyenne. Mais si, indépendamment de leurs concentrations, on utilise, pour titrer, des globules rouges de génotypes différents, l'amplitude du rapport $\frac{n_2}{n_1}$ se modifiera en fonction de la plus ou moins grande teneur en antigène D de ces globules. En prenant les chiffres extrêmes (10), soit pour des globules rouges R_1 $r : 1,8 \cdot 10^{-8}$ Mole/ml de G.R., et pour des globules rouges R_2 $R_2 : 6 \cdot 10^{-8}$ Mole/ml de G.R., il peut être calculé que $\frac{n_2}{n_1}$ varie respectivement du simple au double quelles que soient les concentrations globulaires utilisées pour titrer une même quantité d'un même anticorps.

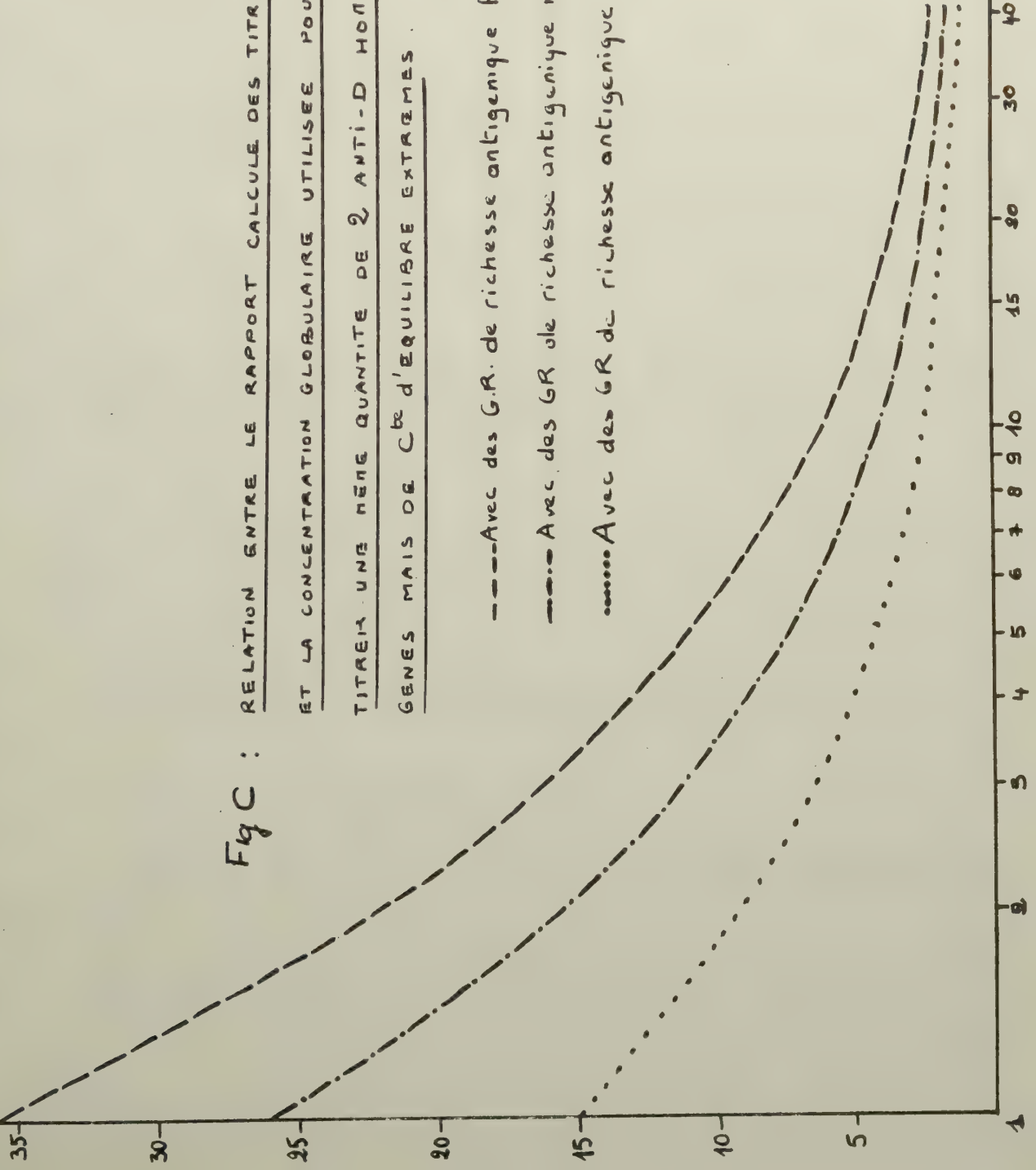
Ceci constitue un des facteurs expliquant les différences de titres trouvés sur un même sérum selon le type de globules utilisés d'un laboratoire à l'autre et d'un jour à l'autre dans le même laboratoire.

Rapport calculé
des titres

Fig C : RELATION ENTRE LE RAPPORT CALCULÉ DES TITRES
ET LA CONCENTRATION GLOBULAIRE UTILISÉE POUR
TITRER UNE MÊME QUANTITÉ DE 2 ANTI-D HOMO-
GENES MAIS DE C^{te} D'EQUILIBRE EXTREMES.

- Avec des G.R. de richesse antigenique faible (10.000 sites/GR)
- .-.- Avec des GR de richesse antigenique moyenne (18.000 sites/GR)
- Avec des GR de richesse antigenique forte (33.000 sites/GR)

C^{te} Globulaire en %
utilisée pour titrer



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION GLOBULAIRE SUR LE T.C.I.

Soit T_1 le titre d'un sérum S obtenu avec une concentration globulaire égale à a .

Soit T_2 le titre du même sérum obtenu avec une concentration de globules identiques y fois supérieure : $y \cdot a$.

Nous pouvons écrire :

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{\frac{N}{\frac{1}{x \cdot K} + a \cdot c}}{\frac{1}{\frac{1}{x \cdot K} + y \cdot a \cdot c}} = \frac{\frac{1}{x \cdot K} + y \cdot a \cdot c}{\frac{1}{x \cdot K} + a \cdot c}$$

Dans la mesure où $(a \cdot c)$ est négligeable par rapport à l'antigène libre, nous pouvons écrire : $a \cdot c = \frac{Agt}{x}$, ce qui donne :

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{\frac{1}{K} + y \cdot Agt}{\frac{1}{K} + Agt}$$

en posant $\frac{T_1}{T_2} = u$ et en sortant K , l'égalité devient :

$$K = \frac{u - 1}{Agt (y - u)} \quad (VI)$$

On voit que si K est très grand, le dénominateur tend vers 0 et u tend vers y .

Si K est très petit, le numérateur tend vers 0 et u tend vers 1.

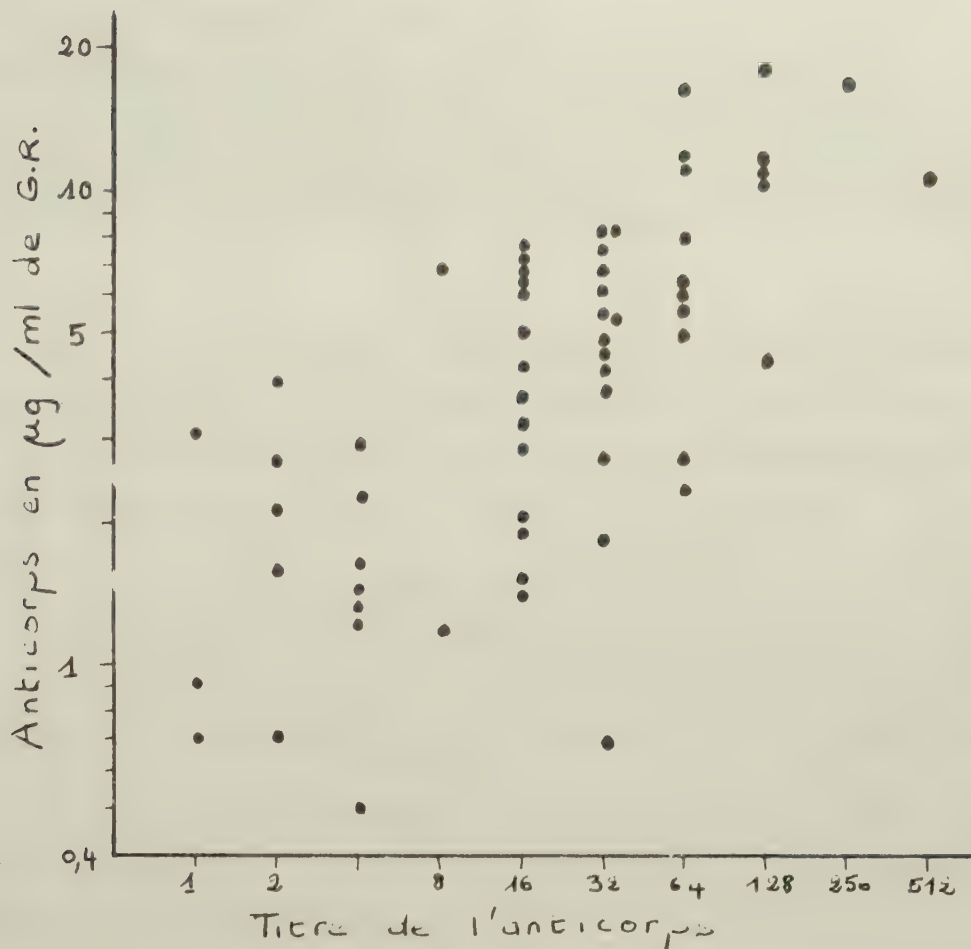


fig d. RELATION ENTRE LA QUANTITE D'ANTI-D FIXE SUR LES G.R.
LE N-NES ATTEINTS DE M.H.N.N. ET LE TITRE DE
L'ANTICORPS ELUE DES NERNES GLOBULAIRES (HETEROCOL.)

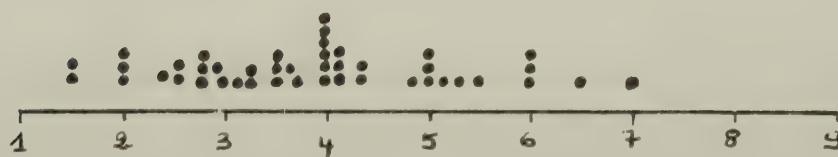


fig e: RÉPARTITION DES RAPPORTS DE TITRES EN C.I. DE
44 ANTI-D INDIVIDUELS, PRATIQUES AUX 2 CONCENTRATIONS GLOBULAIRES
10% ET 1% (VOIR C.A.C.)

C'est-à-dire, que plus la valeur de la constante d'équilibre K d'un anticorps est élevée, plus le rapport des titres trouvés avec cet anticorps à deux concentrations globulaires tend vers le rapport des deux concentrations globulaires utilisées pour le titrer, et qu'inversement, plus la constante K de l'anticorps est basse, plus le rapport des titres tend vers un.

Nous avons pu en vérifier le bien-fondé en titrant en dilutions arithmétiques et dans des conditions techniques aussi identiques que possible 44 sérums de femmes iso-immunisées Rh aux deux concentrations de 1 % et 10 % de globules R₂ r.

Le rapport des titres a varié de 1,5 à 7 (fig. e). La constante d'équilibre de ces anti-D n'a pas été évaluée ; mais la dispersion des résultats comparable à la dispersion des constantes d'équilibre trouvée par HUGHES JONES sur 21 sérums individuels (fig. b), nous paraît probante.

Ainsi un anticorps de constante élevée peut avoir un titre 7 fois plus haut à 1 % de globules rouges qu'à 10 % de G.R. et un anticorps de constante basse seulement 1,5 fois.

Donc, plus la concentration en antigène globulaire utilisée pour titrer un anti-D est faible, plus son titre est élevé. Cependant, plus la constante K de l'anticorps à titrer est basse, moins cette variation du titre est grande.

CONCLUSION

Interviennent donc dans le titre d'un anti-D à la fois la quantité de l'anticorps et son degré d'affinité pour l'antigène Rh. Le rôle de la concentration en antigène globulaire utilisée pour titrer est double :

- d'abord dans la sensibilité de la méthode :

plus la concentration globulaire est élevée, plus le titre sera bas et, inversement, un anti-D présent dans un sérum à l'état de traces

ne pourra être détecté que grâce à de très faibles concentrations d'hématies.

(On ne peut donc comparer les titres de deux anti-D que si la même concentration en antigène globulaire Rh a été utilisée : la concentration globulaire et la richesse antigénique des hématies doivent être toujours les mêmes).

- La concentration globulaire a aussi un rôle capital en fixant, pour chacune de ses valeurs données, l'influence respective sur le titre, de la quantité de l'anti-D et de son affinité pour l'antigène Rh. Ainsi, une faible concentration de globules rouges fait jouer un rôle majeur à la constante d'équilibre de l'anti-D à titrer alors que, inversement, une concentration très élevée de globules rouges fait jouer un rôle prépondérant à la quantité de cet anti-D.

Par exemple, un anti-D de constante d'équilibre élevée ayant un titre plus haut qu'un anti-D de constante d'équilibre basse à 1 % de globules rouges, peut avoir un titre plus bas que ce dernier, à la concentration de 40 % de G.R.

REPRODUCTIBILITE DU TITRAGE EN T.C.I.

Il est donc essentiel, pour comparer deux anti-D, que la concentration en antigène Rh utilisée pour titrer soit rigoureusement la même. Toute tentative de standardisation du titrage en T C I devrait être intrinsèque sur ce point. Les chiffres donnés par l'O.M.S. (6) n'ont donc rien d'étonnant quand on sait l'insuffisance de standardisation du titrage T C I en ce domaine. Si l'on ajoute à cela les erreurs inhérentes à toute technique manuelle et le fait que l'agglutination finale dépend du type, de la concentration de l'anti-globuline utilisée, et aussi.... de l'observateur, on peut concevoir qu'un même sérum titré par différents laboratoires puisse donner des résultats aussi différents que 1/64 et 1/1024.

Il n'en reste pas moins qu'au sein d'un même laboratoire les écarts sont moindres, la méthode de titrage étant moins sujette à variations dans un même laboratoire qu'entre plusieurs laboratoires.

Les anti-D que nous avons titré à deux reprises, le même jour ou à quelques jours d'intervalle, dans les mêmes conditions techniques en dilutions arithmétiques (temps d'incubation, concentration identique de globules rouges de même phénotype, même dilution de l'anti-globuline,.....) ont toujours eu des titres très voisins (plus ou moins 20 % au maximum). Nous sommes donc persuadés que le titrage en Coombs des anti-D donne une reproductibilité très acceptable, s'il est réalisé avec soin dans des conditions techniques rigoureusement semblables, et avec une concentration en antigène globulaire fixe.

QUELLE CONCENTRATION GLOBULAIRE CHOISIR POUR TITRER LES ANTI-D DANS LA SURVEILLANCE DE L'INCOMPATIBILITE FOETO-MATERNELLE ?

Dans l'éventail des concentrations globulaires disponibles, laquelle prendre ?

Doit-on privilégier la constante d'équilibre des anti-D en les titrant à des concentrations globulaires faibles ou, au contraire, privilégier la quantité de l'anticorps en le titrant à des concentrations globulaires élevées ?

On peut définir la concentration globulaire idéale pour titrer comme celle qui permettrait d'obtenir des titres égaux pour tous les anti-D saturant une même quantité d'antigène Rh chez le fœtus, quelle que soit la valeur de cette saturation.

En assimilant la concentration en antigène globulaire Rh total du fœtus à 40 % de globules $R_2 r$, le calcul théorique va nous fournir des indications.

Soit Q_1 la concentration en anti-D d'un sérum pur, nécessaire pour saturer, in-vivo, un pourcentage donné de sites antigéniques et Q_2 la concentration d'un anti-D de constante d'équilibre différente d'un autre sérum pur, nécessaire à la saturation du même pourcentage in-vivo.

Pour que ces deux anti-D aient des titres égaux il est évident, par définition, que le rapport de leurs concentrations dans la dernière dilution

donnant leur titre final, doit être le même que le rapport de leurs concentrations dans le sérum pur. C'est en jouant sur la concentration globulaire utilisée pour titrer ces anticorps qu'il est possible d'obtenir l'égalité de ces deux rapports de concentrations.

Or, en prenant deux anti-D de constantes d'équilibres égales respectivement à $10^9 \text{ Mole}^{-1}/1$ et de $10^7 \text{ Mole}^{-1}/1$, le calcul nous indique que le rapport de leurs concentrations nécessaires pour saturer des pourcentages croissant de sites antigéniques d'une suspension globulaire à 40 %, varie avec cette saturation. Il passe de 2 pour saturer 10 % à 3 pour saturer 60 % et à 5 pour saturer 80 % des sites Rh. Ces pourcentages correspondent respectivement à 4, 24 et 32 μg d'anti-D par ml de globules rouges.

Cependant, on peut noter que l'éventail des quantités d'anti-D observées sur les hématies de nouveau-nés ne s'étend pas au delà de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'hématies, chiffre équivalent à environ 50 % de saturation d'hématies R_{2r} . (3)

Dans ces conditions, le rapport des concentrations des deux anti-D considérés varie de 2 pour les pourcentages les plus faibles à 3 pour les pourcentages les plus élevés réellement observés in-vivo. Une approximation très satisfaisante pourra donc être obtenue quand le rapport des concentrations de ces deux anti-D présentes dans la dilution donnant leur titre final, sera voisin de 2,5.

Ce rapport nous est donné quand la concentration globulaire choisie pour titrer est de 23 % de globules rouges de phénotype R_{2r} . (fig. g).

Le calcul nous montre, par ailleurs, que cette concentration globulaire, valable pour ces deux anti-D d'affinités extrêmes, l'est également pour tous les autres anti-D d'affinités intermédiaires.

Cette concentration de 22 % de globules rouges R_{2r} est donc théoriquement celle qui permet, dans tous les cas, d'obtenir la meilleure relation entre le titre des anti-D, quels qu'ils soient, et leur "pouvoir toxique" chez le fœtus. (fig. g)

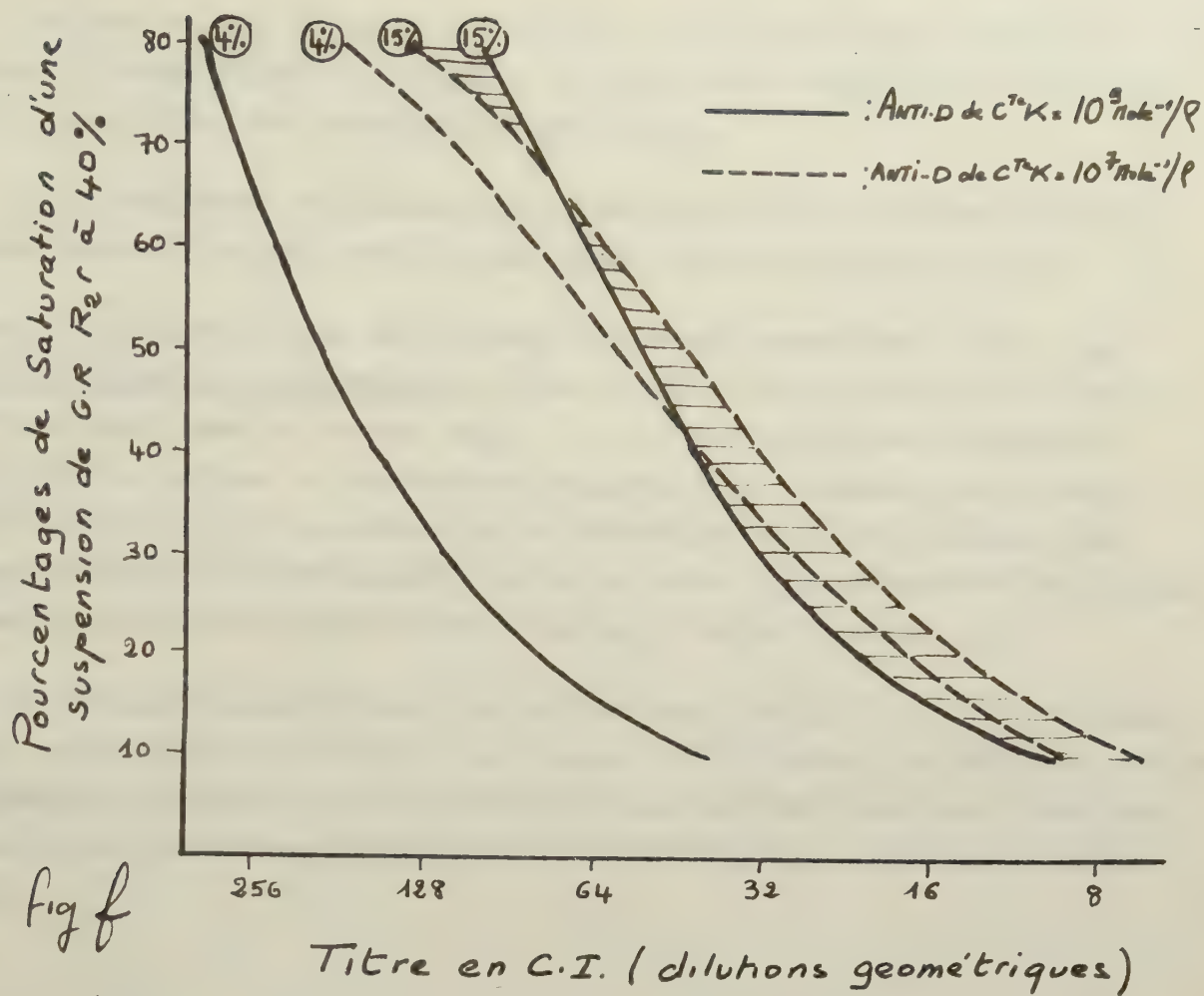


fig f

Rapports des Q. d'Anti-D de C^{7K} égaux à $10^9 \text{ mole}^{-1}/l$ et $10^7 \text{ mole}^{-1}/l$ nécessaires pour saturer des % croissant de sites Rh d'une suspension de G.R. R₂r à 40%.

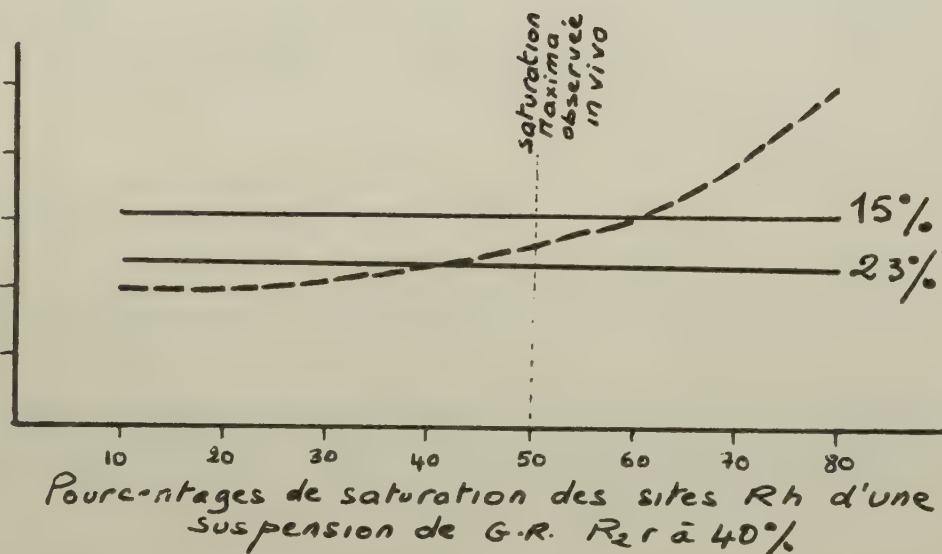


fig g

Cependant, une telle concentration à l'inconvénient d'abaisser fortement la sensibilité du titrage, ce qui est peu compatible avec l'utilisation, générale, des dilutions géométriques.

Le choix d'une concentration globulaire à 10 % ou mieux à 15 % de globules rouges $R_2 r$ est, dans la pratique, très satisfaisant car :

- de telles concentrations globulaires (élevées) permettent encore une relation théorique très valable entre le titre des anti-D et leur "pouvoir toxique" chez le fœtus (fig. f). Il sera d'ailleurs inutile de vouloir trop affiner la concentration globulaire utilisée pour titrer aussi longtemps que la méthode et la technique de titrage Coombs, tel qu'on la pratique généralement, resteront aussi approximatives (technique manuelle, dilutions géométriques, absence d'anti-D témoin
- avec de telles concentrations, on obtient une échelle de titres comparable à celle obtenue avec 4 %. Les titres à 1/512 sont, bien entendu, moins fréquemment observés, mais la baisse de sensibilité n'est pas déroutante et est tout à fait compatible avec l'utilisation des dilutions géométriques.

D E U X I E M E P A R T I E

L'utilisation de l'analyse automatique en veine liquide continue dans la mesure de l'activité hémagglutinante des sérums de femmes iso-immunisées Rh comporte deux avantages :

- Le premier avantage découle de la mise en oeuvre d'une instrumentation qui, contrôlant rigoureusement et de façon maintenue les différents paramètres de la réaction D anti-D, permet, en outre, l'objectivation des résultats de la réaction par des procédés de mesure colorimétrique et d'enregistrement sur papier.

La bonne reproductibilité des résultats en est le corollaire. Elle va permettre une comparaison valable de l'activité agglutinante (A.A.) d'un sérum maternel tout au long de la grossesse.

- Le second avantage réside dans la haute concentration en antigène globulaire utilisée dans l'appareil. Nous avons vu au chapitre précédent quels avantages théoriques on pouvait en espérer dans le cas particulier de la surveillance de femmes enceintes iso-immunisées Rh.

MATERIEL ET METHODE

La technique utilisée est celle, peu modifiée, préconisée par ROSENFELD et HABER (Technicon Symposia 1965).

L'appareil pompe en continu une suspension à 30 % de globules R_2^r qui sont traités dans l'appareil même par la broméline. Les sérums à

étudier, prélevés en discontinu, sont mis au contact des globules broméliés dont l'agglutination est ensuite favorisée par une solution de dextran. Les rouleaux formés par le dextran sont, plus loin, dissociés par une solution saline à 9 %. Les agglutinats sont ensuite piégés dans des tubes en T et les hématies libres hémolysées par une solution de Triton. La mesure photocolorimétrique de la solution d'hémoglobine ainsi formée, est enregistrée sur papier.

Lecture des résultats (CREGUT, Technicon, Lutétia (14)).

La figure (h) montre l'inscription des pics correspondant à l'hémagglutination de 6 dilutions géométriques successives d'un même sérum. Comme on le voit, les sommets des pics sont situés sur une courbe d'aspect sigmoïde dont la partie centrale est sensiblement rectiligne. Toutes les mesures sont faites par rapport à un pool de nombreux sérums individuels dont on sait que le mélange d'au moins 20 tend à conférer aux pools, quel qu'en soit la provenance, des valeurs comparables de l'index d'hétérogénéité et de la constante K moyenne. Dans la mesure de ces pools (faciles à se procurer de différent seulement que par leurs concentrations, ils peuvent servir de standards de référence à tous les laboratoires.

Les dilutions sont faites à la pipette volumétrique en progression géométrique, avec la meilleure précision possible. Chaque dilution utilisable du sérum à tester est toujours accompagnée de la dilution du pool de référence donnant une transmission optique voisine (fig. i), ceci afin de neutraliser le plus possible au cours d'une même séance les variations éventuelles de sensibilité inhérentes à l'appareil et aux réactifs. Il est nécessaire pour un dosage précis d'étudier trois ou quatre dilutions du sérum à tester situées dans la zone de lecture utilisable (c'est-à-dire la partie droite de la sigmoïde) et accompagnée, chacune, d'une dilution du pool de référence. Chaque dosage dure, de ce fait, près d'une heure à la vitesse horaire de 10 prélèvements.

Ce rythme de prélèvement a été choisi le moins rapide possible afin de s'assurer que l'aiguille de l'enregistreur revient à la ligne de base

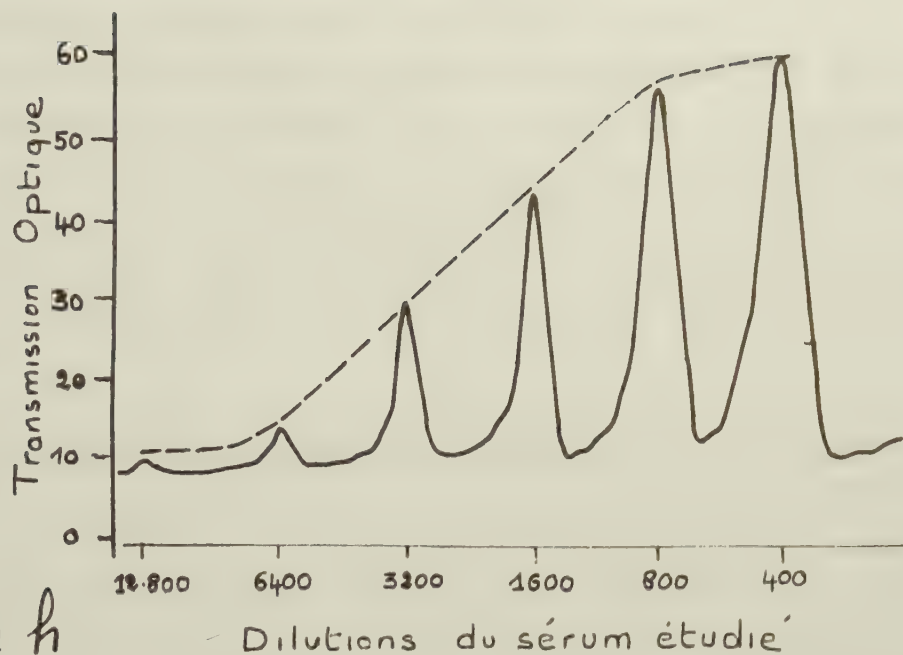


fig h

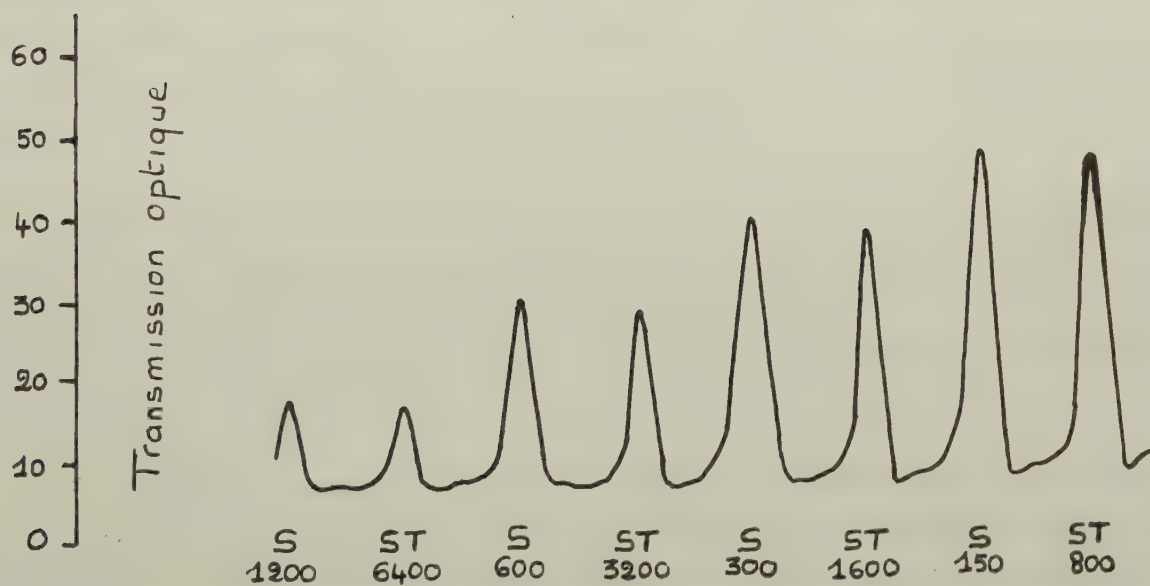


fig i

Dilutions alternées du serum témoin et du serum à doser

entre deux prélèvements. Cette façon de procéder nous semble indispensable pour espérer obtenir une bonne reproductibilité des résultats au cours d'une même séance, d'un jour à l'autre, d'un mois sur l'autre. La lecture est faite sur papier semi-logarithmique et le pourcentage de transmission en ordonnées sur l'échelle arithmétique. La courbe donnée par les résultats du pool de référence est tracée, et les pourcentages de transmission donnés par les dilutions du sérum à tester lui sont comparés. Le fait que plusieurs dilutions d'un même sérum donne le même dosage confirme la validité des résultats.

La reproductibilité de la méthode est bonne : nous l'estimons à plus ou moins 20 %.

Matériel

Les sérums de nombreuses femmes enceintes iso-immunisées Rh ont été dosés pendant une durée plus ou moins longue de leur grossesse. Ces femmes étaient, dans leur grande majorité, connues pour avoir donné naissance, précédemment, à des enfants atteints de maladie hémolytique à des degrés divers. La période couverte par les dosages, effectués à la moyenne d'un tous les mois, a été suffisamment longue pour se faire une idée valable de l'évolution de l'A.A. au cours de la grossesse.

Parmi les femmes ayant accouché d'enfants Rh positif, nous n'avons retenu que celles dont l'A.A. est restée stable pendant cette période de surveillance de façon à constituer un groupe homogène, en excluant les femmes dont l'activité sanguine agglutinante s'était élevée en cours de grossesse.

En effet, ce dernier groupe de femmes ne constitue pas un lot homogène, car les taux de base (avant ascension), le moment de l'ascension, l'importance et la rapidité de cette ascension diffèrent d'une femme à l'autre et, étant donné la grande disparité des cas, il ne nous a pas été possible, compte-tenu du nombre insuffisant de cas dont nous disposions, de constituer des sous-groupes homogènes et d'y confronter l'atteinte de l'enfant avec l'A.A.

RESULTATS

Les résultats sont reportés dans le tableau 1. Ils concernent 28 cas.

- Une première constatation est la bonne corrélation entre le niveau de l'A.A., et l'atteinte de l'enfant à la naissance.

Il nous semble difficile de coter avec certitude le degré de la maladie hémolytique d'un nouveau-né et d'affecter à chaque symptôme un coefficient nécessairement subjectif. Nous nous sommes contentés d'indiquer le terme à la naissance, l'état du foie et de la rate, le taux de bilirubine et d'hémoglobine cordonales et enfin le nombre d'exsanguino-transfusions pratiquées dans chaque cas. On voit ainsi que, jusqu'à une A.A. de 450, les manifestations clinico-biologiques du processus hémolytique s'accroissent graduellement. Seul le chiffre de l'hémoglobine cordonale paraît moins bien relié à celui de l'activité agglutinante, probablement en raison de l'intervention correctrice de l'érythropoïèse.

Cependant jusqu'à 450 il n'y a aucun mort-né ou d'enfant né en état d'anasarque.

Les taux d'hémoglobine sont tous au-dessus de 11 gr à l'exception d'un seul enfant dont les signes de maladie hémolytique étaient très dissociés et qui a été exsanguiné au cinquième jour en raison d'un taux d'hémoglobine à 9,2 gr (au 5ème jour, cas n° 8).

- La deuxième constatation est que, au-dessus d'une zone d'A.A. apparemment étroite (probablement entre 500 et 700) tous les enfants sont morts-nés ou en état d'anasarque s'ils vivaient à la naissance. Cet état gravissime était réalisé pour tous ces enfants avant le terme de 7 mois 1/2.

DISCUSSION

L'excellente relation qui unit le niveau d'A.A. et l'intensité de la maladie hémolytique ne peut être autre que celle qui lie l'anticorps maternel au degré d'atteinte de l'enfant. Il apparaît donc, à l'évidence,

Cas	Activité	Période de la grossesse	Termes à	Etat clinique	Bili	Hb	Nombre d'E.T.
	Agglutinante	couverte par les dosag.	l'acc.	la naissance	cordon		
				Foie	Rate		
n° 1	## 6	: de 2mois1/2 à terme	: 9	: 0	0	: 13 : 15g:	0
n° 2	## 6	: du 6e au 9ème mois	: 9	: 0	0	: 15 : 15g:	0
n° 3	## 15	: de 7e à 8mois1/2	: 9	: 0	0	: - : 15g:	1
n° 4	## 20	: du 4e au 7ème mois	: 7	: +	0	: 22,5 : 14,8:	1
n° 5	## 50	: de 5 1/2 à 8 1/2	: 8 1/2	: 0	0	: 20 : 15g :	0
n° 6	## 50	: de 5 à 8 1/2	: 8 1/2	: 0	0	: 22,5 : 15g :	0
n° 7	## 80	: de 3e à 8 1/4	: 8 1/4	: +	0	: 41 : 15g :	2
n° 8	## 90	: de 4e à 8 1/3	: 8 1/3	: +	0	: 29 : 9,2 au 5 ^e j.	1 (anémie)
n° 9	## 100	: de 6 1/3 à 8 1/2	: 8 1/2	: -	-	: 13 : 11,10:	0
n° 10	## 100	: de 5 à 8 1/2	: 8 1/3	: 0	+	: 29 : 15g :	2 E.T.
n° 11	## 150	: de 4 1/2 à 8 1/2	: 8 1/2	: 0	0	: 21 : 11g7 :	2 E.T.
n° 12	## 150	: de 6 1/2 à 8 2/3	: 8 2/3	: 0	0	: 16 : - :	0
n° 13	## 200	: de 7 1/2 à terme	: 9ème	: 0	0	: max 126 à J4 - :	0
n° 14	## 250	: de 6ème à 7 2/3	: 7 2/3	: ++	0	: 46,5 : 11g5 :	D.C.D. Détresse respiratoire
n° 15	## 300	: de 3e à 8 3/4	: 8 3/4	: ++	+	: 35 : 11,5 :	1
n° 16	## 350	: de 4e à 7 1/2	: 8 1/2	: 0	0	: 23 : 15 g :	1
n° 17	## 350	: de 5 1/2 à 9 mois	: 9	: +	++	: 38 : 15g :	3
n° 18	## 400	: de 3 2/3 à 8 1/2	: 8 1/2	: +	0	: 46,5 : 12,2 :	2
n° 19	## 450	: de 3e à 8 1/4	: 8 1/4	: 0	0	: 42,5 : 15 :	2
n° 20	## 450	: de 2 1/2 à 8 1/2	: 8 1/2	: +	+	: 60 : 13,7 :	2
n° 21	## 700	: de 3 1/2 à 7 1/2	: 7 1/2	: M.N. Macéré anas.		: - : - :	-
n° 22	## 700	: de 3e à 4 1/2	: 6	: M.N. Macéré anas.		: - : - :	-
n° 23	## 800	: du 4e à 7	: 7	: M.N. Macéré anas. 1 T.I.U		: - : - :	-
n° 24	## 1000	: de 2e à 6 3/4	: 6 3/4	: M.N. Macéré anas.		: - : - :	-
n° 25	## 1100	: du 3e au 7e	: 7e	: M.N. Macéré anas:		: - : - :	-
n° 26	## 1200	: de 4 1/3 à 6 1/3	: 7e	: +++ Anas. 1 T.I.U		: 32 : 10 :	4
n° 27	## 1300	: de 2e à 6 1/2	: 6 1/2	: M.N. Macéré anas:		: - : - :	-
n° 28	## 1500	: de 4 à 5 1/2	: 5 1/2	: M.N. Macéré		: - : - :	-

que l'intensité du conflit immunologique chez le fœtus semble commander pratiquement à elle seule l'expression de la maladie. Les facteurs de variation individuels qui, d'un fœtus à l'autre, toucheraient principalement les pouvoirs et capacité de phagocytose du SRE, les facultés de régénération sanguine, le passage transplacentaire de l'anticorps, apparaissent pour le moins secondaires.

On ne peut expliquer autrement l'absence totale de mort-né ou d'enfant vivant en état d'anasarque en deçà d'une zone limitée d'activité agglutinante (A.A.) et leur présence exclusive au delà de cette zone. Il est d'ailleurs assez surprenant de constater la brutalité de cette transition qui témoigne bien de la primauté de l'agression immunologique dont aucun fœtus ne peut faire les frais, passé un certain seuil, alors que pas un d'entre eux n'est menacé de mort au-dessous de ce seuil.

C'est en ces termes que se pose le problème pratique de la surveillance de femmes enceintes immunisées Rh ; et, qu'un enfant ait neuf ou treize grammes d'hémoglobine dans le cordon, selon que ses moyens de défense ont plus ou moins bien réagi, importe peu, du moment qu'une A.A. infra-liminaire nous assure qu'à 8 mois il pourra naître vivant et non gravement atteint (à condition que l'A.A. soit restée stable tout au long de la grossesse).

L'échantillon étudié peut paraître insuffisant pour rendre définitives les conclusions ci-dessus, et il est possible qu'ultérieurement "quelques exceptions viennent confirmer la règle" et atténuer l'excellence de la corrélation observée plus haut. D'autre part, la zone seuil d'A.A. bien que sûrement très étroite n'est pas clairement délimitée et il paraît difficile de prévoir l'avenir d'un fœtus pour une A.A. située dans cette zone.

On peut, en outre, discuter l'extrapolation que nous avons faite à toute la durée de la grossesse d'une A.A. que nous n'avons trouvée stable que pendant une période, limitée seulement, de cette grossesse. Cependant, parmi les femmes dont l'A.A. augmente pendant la grossesse, nous avons pu constater que la survenue d'une ascension franche ne semblait pas se produire avant les cinquième, sixième mois de grossesse, termes couverts

dans presque tous les cas par notre période de surveillance, et que, pendant une telle période il ne nous a jamais été donné de voir chez ces femmes, une évolution en plateau aussi prolongée.

La fig. (j) représente la relation existant entre les A.A. et les titres en TCI classique, trouvés dans les 28 cas étudiés. Les résultats sont exprimés en échelle bi-logarithmique et les variations d'activité agglutinante et de titre sont figurées respectivement par des traits verticaux (A.A. en ordonnées) et horizontaux (titres en abscisses) pour chacun des 28 cas.

On voit que :

- pour une A.A. stable (avec une tolérance de plus ou moins 20 % ainsi qu'il a été dit plus haut) le titre en TCI classique ne varie pas ou varie seulement d'un tube dans à peu près la moitié des cas. Par contre, dans l'autre moitié des écarts de deux, trois, voire quatre tubes sont observés.
- Il n'existe qu'une très médiocre relation entre le titre moyen en TCI et l'atteinte Rh de l'enfant, relation qui explique le faible parti que l'on peut tirer en pratique du titrage classique en TCI, dans la surveillance des femmes iso-immunisées Rh.

Les raisons pour lesquelles le titrage classique en TCI est un médiocre indice du risque qu'encourt le fœtus ont été exposées, partiellement, dans la première partie : elles tiennent à la fois de la méthode et de la technique.

Le titrage en TCI classique est approximatif (dilutions géométriques) imprécis (technique manuelle, lecture de l'agglutination finale), aléatoire (type de dilution de l'antiglobuline utilisée, type de globules). L'automatisation totale réalisée dans l'autoanalizer apporte, au contraire, la rigueur technique de l'instrumentation. Cependant, la supériorité de l'autoanalizer dans la prédiction de l'atteinte Rhésus ne réside pas, principalement, dans ce fait. Elle résulte surtout du heureux hasard qui a présidé au choix d'une concentration élevée en antigène globulaire dans

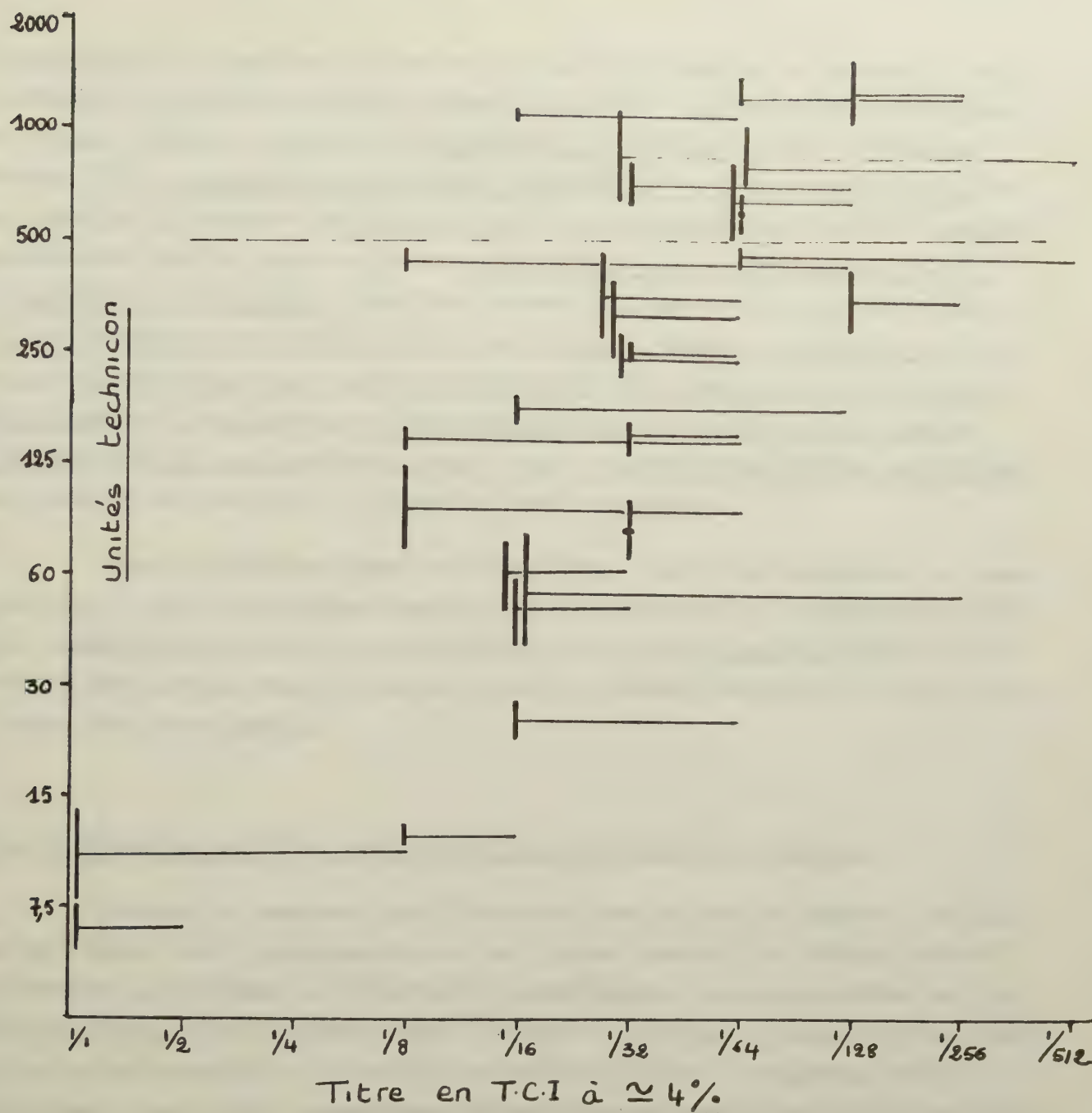


fig j

RELATION ENTRE LE TITRE EN C.I A 4% ET L'A.A. 15%

DANS LES 28 CAS ETUDIES. (Les variations de l'A.A. sont figurées par des traits verticaux ; les variations des titres par des traits horizontaux. pour chaque cas) Au dessus de la ligne pointillée horizontale Tous les cas correspondent à des Mort-nés ou à des enfants nés vivants en état d'Anasarque.

l'appareil (15 % environ). Nous en donnons pour preuve la figure (k) qui représente la relation trouvée entre l'activité agglutinante et le titre en Coombs indirect pratiqué en dilutions arithmétiques sur différents sérums à la concentration réellement mesurée de 15 % de globules R_2r . On y voit que la correction apportée par une concentration élevée d'antigène globulaire sur le titre en Coombs qui devient alors étroitement lié à l'activité agglutinante, justifie les conclusions de la première partie : il est illogique de titrer à des concentrations faibles d'antigène Rh (4 % de globules rouges) des anticorps maternels qui in-vivo sont au contact de concentrations élevées en antigène globulaire quand on sait que le comportement de ces anticorps face à des concentrations fortes ou faibles de globules Rh positif n'est pas du tout comparable.

Ainsi, utilisées dans ces conditions, ces deux techniques de dosages tout à fait différentes donnent, à la différence de sensibilité près des résultats identiques qui expriment une activité agglutinante dont la valeur pronostique dans la surveillance de femmes immunisées Rh, est, nous l'avons vu, très grande.

Que représente, en fait, cette activité agglutinante 15 % R_2r ?

Lorsque on compare dans l'autoanalyser un pool à tester à un pool de référence dont la concentration en μg est connue, la méthode permet d'établir par l'étude de l'activité agglutinante la concentration en μg d'anti-D de ce pool (HUGHES JONES, CREGUT). Lorsque la concentration n'est plus la seule variable entre les deux échantillons à comparer, mais que diffèrent aussi leurs constantes d'équilibre et leur index d'hétérogénéité, il n'est pas sûr que l'on soit en droit d'exprimer les résultats en μg . En effet, dans l'hypothèse où la technique de dosage utilisée dans l'autoanalyser ne modifie pas la réaction D anti-D, nous savons (cf première partie) qu'interviennent dans la fixation de l'anticorps sur les globules rouges outre la concentration, la constante d'équilibre et l'index d'hétérogénéité.

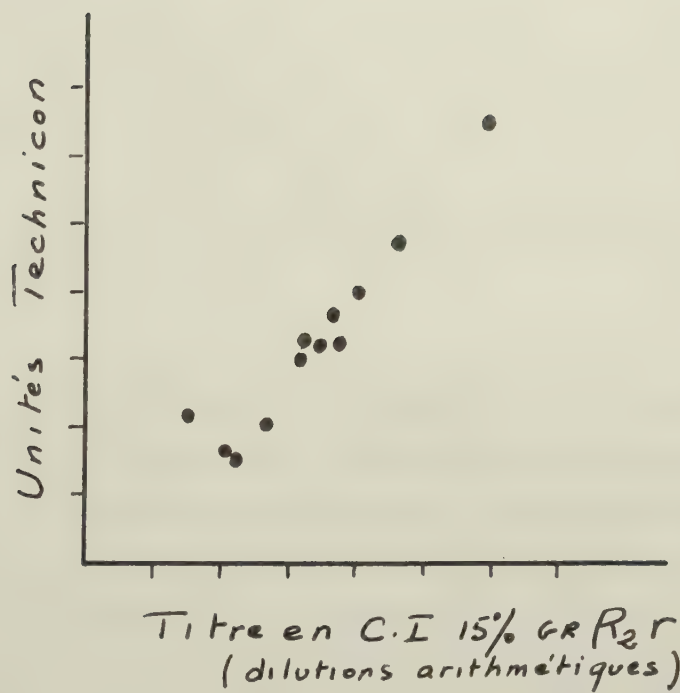


Fig k.

RELATION UNITES TECHNICON - TITRE
EN C.I. A LA MEME CONCENTRATION
DE GLOBULES R₂r (15%) 12 SERUMS

Il est vrai, du moins sur le plan théorique, que la concentration élevée en antigène globulaire utilisée dans l'autoanalyser, permet d'atténuer l'influence de ces deux derniers facteurs. Nous avons vu pourtant précédemment, que pour obtenir à la concentration de 15 %, une égale sensibilisation des globules rouges par deux anticorps homogènes de constantes d'équilibre extrêmes il fallait 3,2 fois plus d'anticorps de constante basse que d'anticorps de constante élevée.

Afin de savoir si les modifications apportées dans l'autoanalyser (temps écourtés de réaction, température, Broméline...) pouvaient modifier les données de la réaction D anti-D et en particulier la constante d'équilibre, nous avons titré en dilutions arithmétiques une cinquantaine d'anti-D aux deux concentrations de 10 % et 1 % de globules R₂r afin d'avoir un ordre de grandeur de leur constante K. La comparaison des titres 10 % et de l'activité agglutinante 15 % de l'autoanalyser des mêmes anticorps nous a montré d'une part, que la relation titre 10 % et activité agglutinante 15 % est bonne et qu'il n'y a pas d'autre part, de relation apparente entre la répartition des titres de différents anticorps pour une activité agglutinante donnée et leur constante d'équilibre estimée,

C'est peut être dans ce sens qu'il faut aussi interpréter les résultats donnés par STURGEON qui, comparant l'activité agglutinante 15 % et concentration de plusieurs anti-D, a constaté qu'à égale concentration en μg l'activité agglutinante pouvait varier selon l'anticorps dans un rapport de 1 à 4 (15).

Si ce facteur de variation est réellement lié, dans l'autoanalyser, à la constante d'équilibre des différents anticorps et si, d'autre part, l'influence de la constante d'équilibre sur la réaction D anti-D *in-vivo* est celle que nous indique le calcul théorique (c'est-à-dire du même ordre de grandeur), il y a tout lieu de penser que l'activité agglutinante d'un anticorps évaluée à haute concentration d'antigène globulaire reflète, mieux que le dosage pondéral, sa toxicité éventuelle chez le fœtus.

CONCLUSION

Nous avons tenté de montrer que dans le déterminisme de la gravité de l'atteinte Rh, l'intensité du conflit immunologique chez le foetus joue le rôle essentiel et quasi exclusif.

Apprécier directement l'intensité et la durée de ce conflit immunologique chez le foetus, suivre ses variations tout au long de la grossesse afin d'en donner un indice global n'est cependant pas possible. Un moyen indirect d'approche constitue l'étude de l'anticorps maternel et de ses variations au cours de la période gravidique.

Mais force est de reconnaître que le titrage des anti-D par la technique classique en TCI (à 4 % de globules rouges) apporte des indications très souvent décevantes sur le risque encouru par le foetus. Il nous a alors semblé, après les travaux menés sur les anticorps anti-D et la réaction D anti-D par HUGHES JONES et coll., que les méthodes de titrage des anti-D devaient être à reconsidérer dans l'optique de la surveillance des femmes enceintes iso-immunisées Rh.

L'analyse critique du titrage en TCI nous a conduit dans une première partie à la conclusion qu'il fallait élever sensiblement la concentration globulaire utilisée pour titrer si on voulait espérer une meilleure corrélation entre le titrage des anticorps maternels et l'atteinte de l'enfant.

L'utilisation d'une autre méthode de dosage des anti-D, entièrement automatisée et apparemment très différente du titrage en TCI nous en

a apporté confirmation, dans une deuxième partie, grâce à l'excellente relation existant entre l'atteinte Rh et le niveau d'activité hémagglutinante des sérums maternels dans 28 cas homogènes. L'intérêt des dosages d'anti-D en autoanalyzer est en effet, d'allier à une précision technique bien supérieure aux dilutions géométriques manuelles, l'utilisation d'une concentration globulaire à 15 %. Nous avons ainsi pu montrer, qu'en titrant aussi soigneusement que possible des anti-D en Coombs indirect à la même concentration globulaire, les résultats des deux méthodes de dosages coïncidaient.

La méthode en Coombs indirect n'est donc pas tellement moins bonne que la méthode en autoanalyzer à condition de lui conférer une meilleure précision technique en substituant aux trop grossières dilutions géométriques l'emploi de dilutions arithmétiques, comparativement à un anti-D témoin. Cependant, une telle méthode de titrage est, dans la pratique routinière de dosage des anti-D, d'un maniement délicat et de réalisation plus laborieuse que la méthode en autoanalyzer qui reste, de toutes façons, techniquement plus sûre.

En conclusion, il n'y a pas une mais plusieurs façons de doser les anti-D. Tout dépend dans quel but on pratique ce dosage. S'il s'agit d'anti-D utilisé en prévention Rh, le dosage pondéral constitue, du fait de l'homogénéité des pools d'anti-D, la meilleure méthode. Si par contre, on dose des anti-D maternels en vue de la surveillance d'une incompatibilité foeto-maternelle Rh, il est nécessaire de tenir compte à la fois de l'aspect quantitatif et qualificatif d'anti-D qui sont obligatoirement très hétérogènes. On doit alors s'efforcer de n'avantager ni l'un ni l'autre de ces aspects, mais tenter de traduire dans le dosage leurs influences réelles dans le conflit immunologique Mère fœtus.

Vu, le Président de Thèse

Pr. R. ANDRE

Vu, le Doyen de la Faculté

Professeur J. LOYGUE

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

G. MALLET

B I B L I O G R A P H I E

1 - MOLLISON

Blood Transfusion in Clinical Medicine
1 vol. (Blackwell Scientific editions - chapitre VI)

2 - MOLLISON P.L., HUGHES JONES N.C.

The clearance of Rh positive red cells BY LOW CONCENTRATIONS OF Rh
Antibody
Immunology, vol. 12, p. 63-196

3 - HUGHES JONES N.C., HUGHES M.I.J., WALKER W.

The Amount of Anti-D on Red cells in haemolytic disease of the new-born
born
Vox sanguinis 12 : 12 : 279-285 - 1967

4 - CREGUT R.

In thèse BARDOU - 1966

6 - MASOUREDIS S.P.

J. Clin. Invest. 39, 1011- et 1450 - 1960

7 - HUGHES JONES N.C., GARDNER B., TELFORD R.

Biochem. J. 85-466 - 1962

8 - HUGHES JONES N.C., GARDNER B., TELFORD R.

Studies on the reaction between the Blood group Antibody Anti-D
and erythrocytes
Biochem. J. 88, 435-440 - 1963

9 - COSTEA N., SCHWARTZ R., CONSTANTOULAKIS M., DANESHEK W.

The use of radioactive antiglobulin in detection of erythrocyte
sensitisation
Blood, 20 - 214 - 1962

10 - HUGHES JONES N.C.

THE ESTIMATION OF THE CONCENTRATION AND EQUILIBRIUM CONSTANT of
ANTI-D
Immunology, 12 - 565 - 1967

11 - ROCHINA E., HUGHES JONES N.C.

The use of purified 125 I Labelled Anti-Gamma-Globulin in the determination of the number of D Antigen SITES ON red cells of different phenotypes.

Vox. Sang. 9 : 385 - 395 - 1965

12 - HUGHES JONES et coll.

Optimal conditions for detecting Blood group Antibody by the Anti-globulin Test

Vox. Sanguinis : 9 - 385-395 - 1964

13 - DUPUY M.E., ELLIOT M., MASOURDIS S.P.

Relationship between red cell Bound Antibody and Agglutination in the Antiglobulin reaction

Vox. Sang. 9 - 40 - 1964

14 - CREGUT R.

Emploi de l'Auto-Analyzer pour la mesure précise du poids d'Anticorps d'un pool de sérums Anti-D

Coloque sur les applications de l'Analyse automatique en immunologie - Hôtel Lutetia - 1969

15 - STURGEON P., KAYE B.

An evaluation of The simple Channel Autoanalyzer in The Quantitation of Anti-Rh °

Vox - Sang. 19 : 14-33 - 1970

